

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



P4/D8 (prio of D8)

Bescheinigung

Die BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT in 3550 Marburg hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Arzneimittel enthaltend die Untereinheit p40 von Interleukin-12"

am 7. Mai 1993 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol A 61 K 37/02 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 19. November 1993
Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Schütz

ichen: P 43 15 127.2

11.12.04.94

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT

HOE 93/B 006 - Ma 974

Dr. Bc/hg

**Arzneimittel enthaltend die Untereinheit p40 von
Interleukin-12**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Arzneimittel enthaltend die Untereinheit p40 von Interleukin-12. Dieses Arzneimittel ist besonders geeignet zur Behandlung von Krankheiten, die mit einer Fehlregulation des Immunsystems einhergehen.

Immunreaktionen können durch unterschiedliche T-Zell Populationen unterstützt werden. Je nach Typ der Immunreaktion leisten dann bevorzugt T-Helfer Zellen des Typ 1 (TH1) oder T-Helfer Zellen des Typ 2 (TH2) Hilfe für eine Immunreaktion. TH1-Zellen unterscheiden sich von TH2-Zellen, soweit bisher bekannt, insbesondere durch die Produktion unterschiedlicher Cytokine.

Bereits 1989 konnten Dunn et al. (J. Immunol. 142:3847 ff, 1989) zeigen, daß TH-1 Klone gamma-IFN produzieren, vorausgesetzt, sie wurden in Anwesenheit akzessorischer Zellen und IL-2 kultiviert. Außerdem konnten Germann et al. (Eur. J. Immunol., 8:1857-1862, 1991) zeigen, daß für die gamma-IFN-Synthese durch TH1 Zellen ein löslicher Mediator benötigt wird. Aus vergleichenden Untersuchungen ging hervor, daß der von Germann et al. als TSF bezeichnete Mediator identisch mit murinem IL-12 ist. Kürzlich konnte dann von Mengel et al. (Eur. J. Immunol. 22:3173-3178, 1992) im Überstand der aktivierten murinen B-Zell Lymphomalinie A-20 ebenfalls ein löslicher Faktor beschrieben werden, der die gamma-IFN Produktion bei T-Zellen stimuliert. Der im A-20 Überstand von

Mengel beschriebene lösliche Mediator wird funktionell mit einem sogenannten "Human Natural Killer Cell Stimulatory Faktor (NKFS)" (Wolf, S.F. et al., J. Immunol., 156:3074, 1991) verglichen und als murines Analog zum humanen IL-12 postuliert. Sowohl von IL-12 als auch von NKSF, die potentiell identisch sind, ist bekannt, daß sie die gamma-IFN Synthese stimulieren. Selbstverständlich ist die Funktion von IL-12 (entsprechend NKSF) nicht auf die Stimulation der gamma-IFN Produktion beschränkt. Unter anderem beeinflußt IL-12 (entsprechend NKSF) auch die Funktion von natürlichen Killer-Zellen (sogenannten NK- oder LGL-Zellen), die IgE-Produktion und steigert die IL-12 induzierte Proliferation ruhender peripherer mononuclearer Zellen.

Von IL-12 ist außerdem bekannt, daß es aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht, die als p35 und p40 bezeichnet werden (Podlaski, F. J. et al. (1991) Arch. Biochem. Biophys. Vol. 294, No. 1, pp. 230-237). Eine nahezu identische Struktur wurde auch für murines IL-12 gefunden (Schoenhaut D. S. et al. (1992) J. Immunol. Vol. 148, No. 11, pp. 3433-3440). Für die p40 Untereinheit von IL-12 wurde gezeigt, daß sie alleine zwar keine IL-12-spezifische Bioaktivität besitzt, daß sie aber für die Bioaktivität des kompletten IL-12-Moleküls von wesentlicher Bedeutung ist. Es wurde spekuliert, daß die p40-Untereinheit direkt mit dem zellulären IL-12-Rezeptor interagiert.

Die Fehlregulation der Produktion und der Wirkung von Cytokinen ist gemäß einer ganzen Reihe von Publikationen an der Entstehung akuter und chronischer Erkrankungen des Immunsystems mit ihren Folgeerscheinungen ursächlich beteiligt. Ein therapeutischer Ansatz könnte daher in der Beeinflussung cytokinvermittelter Aktivitäten liegen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zu Grunde, ein Arzneimittel zur Verfügung zu stellen, das sich vorteilhaft zur Behandlung pathologischer Zustände einsetzen läßt, die mit einer Dysregulation IL-12-vermittelter Aktivitäten einhergehen.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß sich die p40-Untereinheit des IL-12 zur Inhibition IL-12-vermittelter Aktivitäten einsetzen läßt. Damit ist es nun möglich, durch ein Eingreifen in die genannten Regulationsmechanismen eine therapeutische Wirkung zu erzielen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit ein Arzneimittel enthaltend eine natürliche oder rekombinante, möglicherweise modifizierte Untereinheit p40 von IL-12 aus Säugern. Modifizierte Untereinheiten p40 im Sinne der Erfindung sind wirksame Teile oder Varianten von p40, wobei Wirksamkeit beispielsweise im Tiermodell (Maus) oder in vitro, entsprechend den in den Beispielen angegebenen Verfahren nachgewiesen werden kann.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft ein Arzneimittel enthaltend eine Untereinheit p40 humanen Ursprungs.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Diagnostikum enthaltend eine natürliche oder rekombinante Untereinheit p40 von IL-12 aus Säugern, bevorzugt aus Geweben oder Zellen humanen Ursprungs.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung der natürlichen oder rekombinanten, möglicherweise modifizierten Untereinheit p40 von IL-12 aus Säugern, bevorzugt menschlichen Ursprungs zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung pathologischer Zustände, die mit einer Dysregulation IL-12-vermittelter Aktivitäten einhergehen, wie z. B. rheumatoide Arthritis, Autoimmunerkrankungen, wie

Systemischer Lupus erythematodes, Wegeners Syndrom oder rheumatische Arthritis, bakterielle oder virale Infektionen und bestimmte solide Tumoren oder Leukämien.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Verwendung der natürlichen oder rekombinanten, möglicherweise modifizierten IL-12-Untereinheit p40 aus Säugern in einem Verfahren zum Nachweis von IL-12 in Körperflüssigkeiten, z. B. vom Menschen. Dieses Verfahren beruht auf einer spezifischen Inhibition der IL-12-Aktivität durch p40 und kann z. B. analog zu den Beispielen 1 bzw. 2 erfolgen, indem das eingesetzte IL-12 aus der zu analysierenden Probe stammt und p40 in einer definierten Menge zugesetzt wird.

Bevorzugt sind alle diejenigen der genannten Verfahren, die natürliches oder rekombinantes p40 humanen Ursprungs verwenden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Diagnostikum enthaltend IL-12 zum Nachweis der IL-12-Untereinheit p40. Die Anwendung dieses diagnostischen Mittels kann z. B. analog zu den Beispielen 1 bzw. 2 erfolgen, indem die eingesetzte p40-Inhibitoraktivität aus der zu analysierenden Probe stammt und IL-12 in einer definierten Menge zugesetzt wird.

Die Erfindung wird außerdem durch die Beispiele und die Ansprüche erläutert.

Gewinnung von IL-12 und p40:

Zur Gewinnung von rekombinantem murinen IL-12 bzw. der p40 Untereinheit von mIL-12 wurde über Standardverfahren (Sambrook, J. Fritsch, E., Maniatis, T., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) aus klonierten TH2-Zellen mRNA isoliert und diese in doppelsträngige cDNA überführt.

Unter Verwendung der in Schoenhaut et al. (Schoenhaut, D., Chua, A.O., Wolitzky, A.G., Quinn, P.M., Dwyer, C.M., McComas, W., Familletti, P.C. Gately, M.K., Gubler, U. (1992). J. Immunol. 148, 3433) beschriebenen Primer und unter den vorgegebenen experimentellen Bedingungen wurde eine PCR durchgeführt, bei der ein etwa 800 Basenpaar-Fragment generiert werden konnte.

Das PCR-Fragment wurde nach Standardverfahren sequenziert (Sambrock J. Fritsch, E., Maniatis, T., (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Als Ergebnis wurde gefunden, daß die experimentel ermittelte cDNA-Sequenz identisch mit der publizierten Sequenz der murinen p40-Untereinheit ist. In analoger Weise wurde das PCR-Fragment für die p35-Untereinheit isoliert und sequenziert. Zur Bestätigung, daß die nachfolgend beschriebenen biologischen Aktivitäten tatsächlich von IL-12 bzw. von der p40-Untereinheit resultieren, wurden die PCR-Fragmente einzeln bzw. kombiniert in den Vektor pABstop einkloniert und über ein Standardverfahren in BHK-21 Zellen stabil exprimiert (Zettlmeißl G, Wirth, M., Hauser, G., Küpper, H.A. (1988) Behring Inst. Mitteilungen 82, 26).

Aus Kulturüberständen von transfizierten BHK-21 Zellen konnte sowohl biologisch aktives mIL-12 bzw. eine biologisch aktive p40-Untereinheit von mIL-12 isoliert werden.

Als Quelle für ein natürliches IL-12 dienten Überstände der murinen B-Zell-Lymphomalinie A-20 (American Type Culture Collection, ATCC TIB208), die entsprechend der von Mengel et al. (s.o.) beschriebenen Methode aktiviert wurde. Der im A-20 Überstand von Mengel beschriebene lösliche Mediator wird funktionell mit NKSF verglichen und gilt als murines Analog zum humanen IL-12. Eine weitere Quelle für natürliches IL-12 stellten T-Zell Klone des TH2-Typs dar, die entsprechend der von Germann et al. (s.o.) beschriebenen Methode hergestellt

und aktiviert wurden. Vergleichende Untersuchungen zeigten, daß das von Germann et al. beschriebene TSF identisch mit mIL-12 ist.

Als natürliche Quelle für die p40-Untereinheit des murinen IL-12 konnte ein Hybridom isoliert werden, das die p40-Untereinheit des murinen IL-12 sezerniert. Zur Herstellung dieses Hybridoms wurden weibliche Ratten (Stamm Lewis, Zentralinstitut für Versuchstierkunde, Hannover) mit $1-10 \times 10^6$ murinen T-Zellen, die in Anwesenheit von syngenen Monozyten (1×10^5 /ml) und rekombinantem murinem GM-CSF (50 ng/ml) kultiviert worden waren, zusammen mit CFA (Complete Freund's adjuvants) subkutan injiziert. Zwei weitere Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils 2 Wochen, wobei gleiche Zellmengen intraperitoneal injiziert wurden. 3 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere getötet und die Milzzellen nach dem allseits bekannten Standardverfahren von Köhler und Milstein (Nature 256, p. 495ff; 1975) mit den Zellen der murinen Myeloma-Zelllinie SP2/F0 fusioniert. Die Selektion der auswachsenden Hybridoma erfolgte nach Standardverfahren. Untersuchungen, die analog zu dem in Beispiel 1 dargestellten Experiment durchgeführt wurden, zeigten, daß Überstände eines der isolierten Hybridome eine inhibitorische Aktivität auf die gamma-Interferon Freisetzung besitzt. Aus dem Kulturüberstand dieses Hybridoms wurde in Anlehnung an das publizierte Verfahren von Kobayashi et al. ein sezerniertes Protein gereinigt (Kobayashi, M.; Fritz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clar, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989) J. Exp. Med. 170, 827). Nach Reinigung über reverse phase HPLC wurde die isolierte Proteinfraction in einer SDS-Page aufgetrennt, es wurde eine dominante Proteinbande im Bereich von etwa 40-45 kDdal gefunden. Sequenzvergleiche bestätigten, daß das hier isolierte Protein identisch mit der p40 Untereinheit des murinen IL-12 ist.

11 12.04.94

- 7 -

Das Arzneimittel wird schließlich nach dem Fachmann an sich bekanntem Verfahren hergestellt. Die Il-12-Untereinheit p40 (= der Wirkstoff) wird entweder als solche oder in Kombination mit geeigneten pharmazeutischen Zusatz- oder Hilfsstoffen sowie physiologisch annehmbaren Lösungsmitteln in einer wirksamen Konzentration eingesetzt.

Beispiel 1:

Inhibition der IL-12 induzierten gamma-IFN Freisetzung durch p40/IL-12

Zur Induktion der gamma-IFN Freisetzung wurden 5×10^6 Milzzellen von BALB/c-Mäusen für 48 Std. in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von rekombinantem oder natürlichem mIL-12 und IL-2 in den jeweils angegebenen Konzentrationen kultiviert. Nach 48 Std. Kultur wurde der Überstand der Milzzellen geerntet und diese zellfrei zentrifugiert. Der gamma-IFN-Gehalt des Überstands wurde in kommerziell erhältlichen ELISA-Systemen (z.B. IntertestTM-gamma, Mouse IFN-gamma ELISA-kit, Genzyme) bestimmt. Die Quantifizierung von gamma-IFN aus dem Kulturüberstand aktivierter Milzzellen erfolgte im Vergleich zu rekombinantem murinen gamma-IFN (Genzyme). Ein typisches Experiment ist in der Abbildung dargestellt. Wie die Daten zeigen, führte die Kultivierung von murinen Milzzellen mit IL-12 dosisabhängig zu einer gamma-Interferon-Freisetzung von > 5 ng/ml. Wurden jedoch die Milzzellen bei Kulturbeginn mit rekombinantem murinen p40/IL-12 oder mit Hybridoma-Überstand, der die natürliche p40 Untereinheit von mIL-12 enthielt vorinkubiert, und anschließend mit mIL-12 stimuliert, so wurde die IL-12 abhängige gamma-IFN Synthese um mindestens 50 % inhibiert. Dieses hier vorgestellte Beispiel zeigt, daß sowohl rekombinantes p40/IL-12 als auch Hybridoma-Überstand, der die natürliche p40 Untereinheit von mIL-12 enthält, in der Lage ist, die IL-12 induzierte gamma-INF Synthese zu inhibieren.

Beispiel 2:Inhibition der IL-12 induzierten NK-Zellaktivität durch p40/IL-12

Milzzellen von C57BL/6 Mäusen wurden in einer Zelldichte von $5-10 \times 10^6$ Zellen/ml in 24-Loch Costar-Platten für 18 Std. bei 37°C in serumfreiem Iscove's Medium kultiviert. Die Kultivierung der Milzzellen erfolgte in unterschiedlichen Konzentrationen von rekombinantem oder natürlichem murinen IL-12. Nach 18 Std. wurden die Zellen geerntet, die Zellzahl der lebenden Zellen durch Trypan-blau Färbung bestimmt und die zytolytische Aktivität in einem 5-stündigen ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt. Als Zielzellen dienten YAC-1 Zellen (ATCC TIB160). Die ^{51}Cr -Markierung der Zielzellen und die Testdurchführung erfolgte nach Standardmethoden (z. B. Schoenhaut D.S. et al. (1992) J. Immunol. Vol. 148, No. 11, pp. 3433-3440). Die Verhältnisse von Effektor- zu Zielzellen betrugen typischerweise 100:1, 50:1, 25:1, 12.5:1. Die $\%$ -spezifische Zytolyse wurde kalkuliert als $(\% \text{-Lyse der Experimentalgruppe} - \% \text{ Spontanlyse}) : (\% \text{ Maximallyse} - \% \text{ Spontanlyse}) \times 100$. Durch Vorinkubation von C57BL/6-Milzzellen mit IL-12 konnte die spezifische Zytolyse gegenüber Ausgangskontrolle (Ratio 50:1) um mindestens das 5fache gesteigert werden. Wurden unter gleichen Kulturbedingungen die Milzzellen jedoch zusätzlich mit rekombinantem oder natürlichem murinen p40/IL-12 vorinkubiert, so wurde die IL-12 abhängige Zytolyse wiederum um mindestens 50% inhibiert.

M 12.04.94

- 10 -

entansprü he:

HOE 93/B 006 - Ma 974

Dr. Bc/hg

Arzn imittel enthaltend eine natürliche oder rekombinante
möglicherweise modifizierte Untereinheit p40 von Il-12 aus
Säugern.

Arzn imittel nach Anspruch 1, enthaltend p40 humanen Ur-
sprungs.

Diagnostikum enthaltend eine natürliche oder rekombinante,
möglicherweise modifizierte Untereinheit p40 von Il-12 aus
Säugern.

Diagnostikum nach Anspruch 3, enthaltend p40 humanen Ur-
sprungs.

Verwendung der natürlichen oder rekombinanten, möglicher-
weise modifizierten Untereinheit p40 von Il-12 aus Säugern
zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung patho-
logischer Zustände, die mit einer Dysregulation Il-12-ver-
mittelter Aktivitäten einhergehen.

Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß p40
humanen Ursprungs verwendet wird.

Verwendung der natürlichen oder rekombinanten, möglicher-
weise modifizierten Il-12-Untereinheit p40 aus Säugern in
einem Verfahren zum Nachweis von Il-12 in menschlichen
Körperflüssigkeiten.

Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß p40
humanen Ursprungs verwendet wird.

Stimulation der gamma-Interferon-Produktion durch mIL-12

